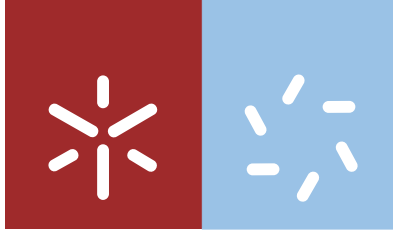


**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

João Carlos Henriques Guimarães

**Interação Biomembranar - Parâmetros  
que influenciam a ligação de dendrímeros,  
peptídeos lipídicos e carregados  
electricamente a biomembranas**



**Universidade do Minho**

Escola de Ciências

João Carlos Henriques Guimarães

**Interacção Biomembranar - Parâmetros  
que influenciam a ligação de dendrímeros,  
peptídeos lipídicos e carregados  
electricamente a biomembranas**

Disertação de Mestrado  
Mestrado de Biofísica em Bionanossistemas

Trabalho realizado sob a orientação do  
**Professor Dimitrios Stamou**

outubro de 2013

## **DECLARAÇÃO**

Nome: João Carlos Henriques Guimarães

Endereço electrónico: joaoguima1985@hotmail.com

Número do cartão de cidadão: 12805668

Título da Dissertação de Mestrado:

Interacção Biomembranar – Parâmetros que influenciam a ligação de dendrímeros, peptídeos lipídicos e carregados electricamente a biomembranas.

Orientador: Professor Dimitrios Stamou

Ano de conclusão: 2013

Designado do Mestrado:

Mestrado de Biofísica em Bionanossistemas

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho,

Assinatura:

## **Prefácio**

Esta tese é parte do requerimento para obtenção do grau de Mestre em Biofísica em Bionanossistemas do departamento de Física e Biologia da Universidade do Minho. Todo o trabalho experimental foi efectuado no Laboratório de Bionanotecnologia e Nanomedicina, Centro de Nanotecnologia da Universidade de Copenhaga. O projecto foi supervisionado pelo Professor Dimitrios Stamou, começando no Verão de 2012.

Gostaria de aproveitar a oportunidade para agradecer as pessoas que repartiram comigo todo o seu conhecimento na área. A assistência diária e encaminhamento por parte do meu tutor Jannik Larssen que tornou tudo possível, obrigado por sempre se disponibilizar a ouvir todas as minhas questões.

Gostaria também de agradecer ao Professor Doutor Dimitrios Stamou por me dar a oportunidade de executar este projecto no seu grupo de investigação, inclusive estou grato a todo o grupo pela atmosfera acolhedora, a entajuda e todos os momentos fantásticos.

Por último gostaria de agradecer á Universidade do Minho pelo apoio financeiro, aos meus país e a minha namorada por todo o suporte e apoio em todo o processo e em todas as minhas decisões.

## Resumo

Todas as células, unidade de vida, apresentam-se compartimentalizadas por uma bicamada lipídica permitindo que numerosos processos ocorram á superfície dos organelos por uma associação reversível de proteínas do citosol. Nestes processos simples parâmetros físicos como, curvatura membranar e/ou densidade de carga poderão ser importantes “inputs” para criar respostas temporais e espaciais.(Bigay & Antonny, 2012).

A maioria dos estudos encontram-se focados em parâmetros físico-químicos das biomoléculas como os maiores reguladores na interacção com membranas. Deste modo o papel desempenhado pelas propriedades membranares não se encontram completamente elucidados.

Neste projecto, eu irei investigar a um nível singular as propriedades físicas das biomembranas e a sua directa influência na associação reversível com biomoléculas. Para este efeito, eu irei utilizar biomoléculas com função definida e analisar o seu comportamento quando importantes parâmetros associados as mesmas são manipulados. De modo a obter estes objectivos, irei utilizar um ensaio “*in-vitro*”, onde lipossomas fluorescentes individuais serão imobilizados numa superfície de vidro e visualizados usando microscopia laser confocal.

Deste modo, eu planeei o uso de lipossomas singulares e monitorizar como os parâmetros membranares afectam a ligação de três classes diferentes de moléculas: primeiramente um péptido lipidado derivado da GTPase N-Ras (tN-Ras), para o estudo da forma da membrana na ligação peptídica. Em segundo o dendrimero (PAMAM G6) para elucidar o papel desempenhado pelas interacções hidrofóbicas e electroestáticas. Por último um péptido derivado da proteína membranar myristoyled alanine-rich C kinase substrate (MARCKS), para o estudo de como o pH de lipossomas individuais poderão regular o recrutamento específico de péptidos altamente catiónicos.

## **ABSTRACT**

All cells, the unit of life, are compartmentalized by a lipid bilayer allowing numerous molecular processes to occur at the surface of organelles through reversible association of proteins from the cytosol. In these processes simple physical parameters such as membrane curvature and/or charge density can be important inputs to create sharp temporal and spatial responses.(Bigay & Antonny, 2012)

Most studies focus on the physicochemical parameters of the biomolecules as the major regulators of the interaction with membranes. This means that the role played by membrane properties are still not fully understood.

In this project, I will investigate at single level the physical properties of biomembranes and their direct influence in the reversible association with biomolecules. For this, I will be using biomolecules with defined function to analyze the behavior when important parameters associated with biomembranes are manipulated. To accomplish these goals, I will use an in vitro assay, where individual fluorescent liposomes are immobilized on a glass surface and imaged using confocal microscopy.

Thus, I planned use of single liposomes and monitor parameters affecting the membrane binding of three different classes of molecules: first lipidated peptide derived from the N-GTPase RAS (tN-RAS) for the study of the membrane shape in the peptide bond. Secondly, a dendrimer (PAMAM G6), to elucidate the role of hydrophobic and electrostatic interactions. Finally, a peptide derived from the membrane protein myristoyled alanine-rich C kinase substrate (MARCKS), to study how the individual pH of liposomes may regulate the recruitment of specific highly cationic peptide.

*"The most beautiful thing we can experience is the mysterious. It is the source of all true art and all science. He to whom this emotion is a stranger, who can no longer pause to wonder and stand rapt in awe, is as good as dead: his eyes are closed."*

*Albert Einstein*

# ÍNDICE

<b>1-INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1-Membrana Plasmática.....	2
1.2-Curvatura Membranar.....	3
1.3-Detecção daCurvatura.Membranar.....	4
1.4-Carga Superficial Membranar.....	6
1.5-Ras GTPase.....	7
1.6-PAMAM Geração 6.....	9
1.7-MARCKS-ED.....	10
1.8-Desvantagens da utilização de ensaios de massa para a investigação da ligação de proteínas lipídadas.....	12
1.9-As vantagens do ensaio de curvatura de lipossomas singulares (SLiC).....	14
<b>2-OBJECTIVO.....</b>	<b>16</b>
<b>3-MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
1.1-Lípidos.....	19
1.2-Solventes.....	20
1.3-Proteínas.....	20
1.4-Soluções-Tampão.....	21
1.5-Composições Vesiculares.....	21
1.6-Composição Lipídica.....	21
1.7-Preparação de Vesículas.....	22
1.8-Imobilização.....	22
1.9-Preparação da Superfície.....	24
1.10- Desenvolvimento do ensaio de lipossomas singulares com curvatura.....	24
1.11- Adição de moléculas intercalantes.....	24
1.12- Microscopia Laser Confocal.....	25
1.13- Definições de Visualização.....	26
1.14- Aquisição de imagens e tratamento de dados.....	26
1.15- Controlos Microscópicos.....	29
1.15-1. Linearidade do “Gain”.....	30
1.15-2. Linearidade do “OffSet”.....	30
1.15-3. Traço do branqueamento do fluoróforo vesicular (Texas Red).....	30
1.16- Calibração do Tamanho Vesicular.....	32
<b>2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>33</b>
2.1-tN-Ras um sensor de curvatura.....	34
2.2-Grau de (In)Homogeneidade.....	35
2.3-PAMAM Geração 6.....	36
2.4-MARCKS-ED e MARCKS mut1.....	39
<b>3. CONCLUSÕES E PRESPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>44</b>
<b>4. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>47</b>



## ABREVIACES

a.a	Amino cido
BAR	Bin/Amphiphysin/RvS
CaM	Calmodulina
DLS	Espalhamento de luz dinâmica
FRET	Transferência ressonante de energia fluorescente
GDP	Guanina Difosfato
GTP	Guanina Trifosfato
GUV's	Vesículas unilamelares gigantes
PBS	Tampão Fosfato Salino
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
Phe	Fenilalanina
PI	Fosfatidilinositol
PKC	Proteína quinase C
PM	Membrana Plasmática
PMT	Tubo Foto-Multiplicador
PS	Fosfatidilserina
PS	Fosfatidilserina
RE	Retículo Endoplasmático
SLiC	Ensaio de Curvatura Lpida
SUV	Vesículas unilamelares singulares

## TABELA DE FIGURAS

<b>Figura1-</b> Mecanismos de deformação membranar.....	4
<b>Figura2-</b> Esquema representativo da ligação em áreas altamente curvadas expondo maior número de defeitos de empacotamento lipídico e consequente aumento de ligação proteica.....	5
<b>Figura 3-</b> Diferenças entre cadeias lipídicas palmitoyl e oleoyl.....	6
<b>Figura 4-</b> Esquema representativo do aumento das forças electrostáticas pelo aumento do conteúdo de PS numa bicamada lipídica.....	7
<b>Figura 5-</b> Esquema ilustrativo da influência de forças electroestáticas, na ligação de MARCKS a membranas.....	11
<b>Figura 6 –</b> Distribuição da sobreposição de vesículas, obtidas por extrusão com filtros de vários tamanhos.....	15
<b>Figura 7-</b> Esquema ilustrativo do modelo de imobilização para o ensaio de lipossomas singulares com curvatura (SLiC).....	22
<b>Figura 8-</b> Representação esquemático do funcionamento do microscópio laser confocal.....	26
<b>Figura 9-</b> Esquema da obtenção e representação das intensidades dos sinais provenientes do canal vesicular e do canal proteico.....	27
<b>Figura 10-</b> Representação do painel de controlo do "Master Particle Analyzer" do Igor Pro com os valores filtrativos utilizados.....	29
<b>Figura 11-</b> Representação gráfica da densidade (a.u.) de tN-RAS em relação ao seu diâmetro, estimado pela raiz quadrada da intensidade.....	35
<b>Figura 12-</b> Representação gráfica logarítmica da densidade proteica de tN-RAS em relação ao diâmetro.....	36
<b>Figura 13-</b> Resultados obtidos no cálculo do grau de inhomogeneidades da bicamada lipídica usando vesículas bimar cadas fluorescentemente com Atto655 e TOPFLUOR PS.....	37

<b>Figura 14-</b> Micrografias dos canais microscópicos evidenciando as populações vesiculares de diferentes teores lipídicos e a acumulação de PAMAM G6.....	37
<b>Figura 15-</b> Representação gráfica logarítmica dos resultados obtidos na co-localização de PAMAM G6 a vesículas com diferentes teores lipídicos. DOTAP25% representa um controlo positivo.....	38
<b>Figura 16-</b> Relação média entre os valores obtidos para o declive e a co-localização percentual de PAMAM G6 nas diferentes populações vesiculares.....	39
<b>Figura 17-</b> Fotografias (A) GUVs no canal vesicular, e de MARCKS-ED no canal proteico, obtidas por microscopia laser confocal; (B) Análise do perfil energético usando o programa ImageJ.....	40
<b>Figura 18-</b> Micrografias dos canais microscópicos evidenciando as populações vesiculares de diferentes teores lipídicos e a acumulação de MARCKS-ED.....	41
<b>Figura 19-</b> Representação gráfica logarítmica dos resultados obtidos na co-localização de MARCKS-ED a vesículas com diferentes teores lipídico.....	41
<b>Figura 20 -</b> Relação média entre os valores obtidos para o declive e a colocalização percentual de MARCKS-ED nas diferentes populações vesiculares.....	42
<b>Figura 21-</b> Representação gráfica logarítmica dos resultados obtidos na co-localização de MARCKS mut1 em vesículas DOPS25%.....	43

# 1

## **Introdução**

A ligação reversível de proteínas a superfícies membranares é um acontecimento crítico para muitos processos biológicos e é normalmente acompanhado por uma interação lipídica com um domínio proteico. (Mulgrew-Nesbit A et al. 2006). Nestes processos, parâmetros físicos como a curvatura membranar e/ou densidade de carga poderão ser importantes “inputs” para a criação de rápidas respostas temporais e espaciais (Bigay & Antonny, 2012) .

A maioria dos estudos encontram-se focados em parâmetros físico-químicos das biomoléculas como os maiores reguladores da interação membranar. Isto significa que o papel desempenhado pelas propriedades membranares continuam ainda não totalmente compreendidos.

## **1.1 Membrana Plasmática**

A membrana plasmática é uma complexa, dinâmica e em não equilíbrio mistura de mais de 7000 espécies de fosfolípidos, ~30-40% de colesterol e ~25% de massa de proteínas membranares integrais e periféricas (Prior et al. 2012). Estes fosfolípidos constitutivos são pequenos em comparação com o tamanho das proteínas. Numa bicamada, cada lípido expõe uma superfície de  $\sim 0.7 \text{ nm}^2$ , onde uma proteína de 20kDa poderá abranger uma dúzia destes lípidos (Liu et al. 2010) Biologicamente, a membrana plasmática representa os limites da vida, e vários processos vitais, tais como tradução de sinais, controlo do ciclo celular e transporte vesicular lhe estão associados. (Bigay & Antonny, 2012)

Vários parâmetros físico-químicos se encontram associados às membranas plasmáticas. Parâmetros membranares como curvatura membranar, defeitos de empacotamento lipídico, carga superficial, graus de (in)homogeneidade (conceito de que a composição lipídica não é idêntica entre os folheto interno e externo da bicamada vesicular) (Larssen

J. et al 2011), domínios lipídicos e pH, poderão ser a chave para a regulação da ligação de biomoléculas a membranas plasmáticas.

## **1.2 Curvatura Membranar**

A curvatura membranar é alterada por interacções com proteínas, incorporações de estruturas trans-membranares ou pela organização de domínios lipídicos. (Figura 1) (McMahon 2005)

Actualmente tem sido reportadas muitas moléculas com a capacidade de detectar e/ou induzir curvatura membranar através de inserções nos domínios hidrofóbicos da membrana. (Peter B. et al 2006).

Uma membrana curvada produz maior número de defeitos de empacotamento lipídico, exibindo as regiões hidrofóbicas e locais constitutivos para a inserção dos motivos hidrofóbicos moleculares. Estes defeitos de empacotamento lipídico não são apenas regulados pelo grau de curvatura mas também por características lipídicas, tais como, geometria, grau de saturação e carga. (Bigay et al 2012) (Neil M. et al 2010).

Considerando este facto, a questão é se a curvatura membranar deverá ser considerada independentemente das interacções electrostáticas ao nível membranar e dos defeitos de empacotamento lipídico, ou se estes parâmetros se combinam para regulação da ligação de moléculas á mesma.

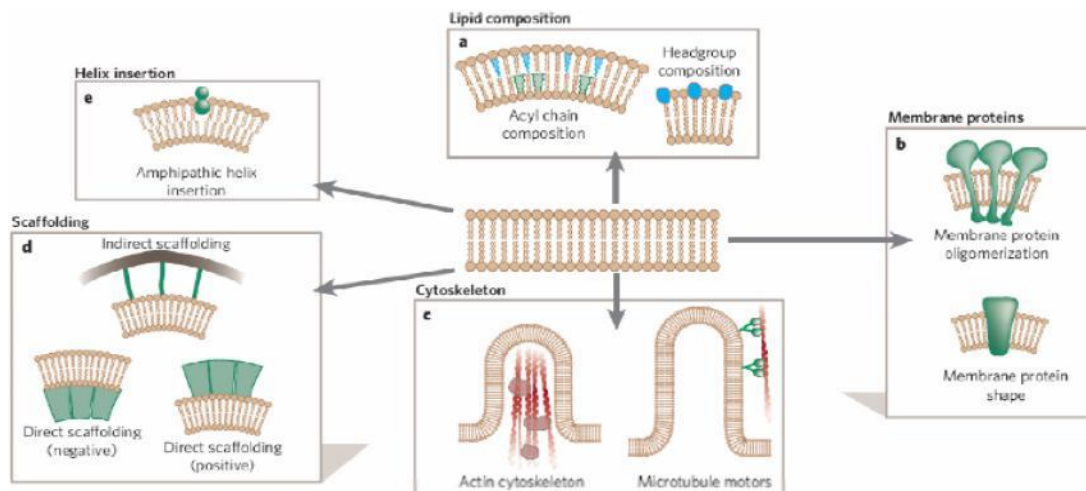


Figura 1- Mecanismos de deformação membranar (adaptado de: McMahon 2005) (A) Mudança da composição lipídica, (B) Agregação de proteínas membranares, (C) mudanças na polimerização do citoesqueleto e mecanismos de stress promovidos por proteínas motoras, (D) moldagem directa e indirecta e (E) inserção de hélices anfipáticas.

### 1.3 Detecção da Curvatura Membranar

O termo detecção ou reconhecimento da curvatura membranar encontra-se associado a dois diferentes processos. Por um lado, detecção refere-se á localização espacial ou redistribuição, onde três tipos diferentes de moléculas, estruturalmente não relacionadas, hélices anfipáticas, domínios BAR (Bin–Amphiphysin–Rvs) e proteínas ancoradoras de membranas, designadas por proteínas com o motivo ALPS (ArfGAP1 Lipid Pack Sensor), (Morton et al.,2012), concentram-se preferencialmente em locais de elevada curvatura membranar. Por outro lado, moléculas onde o seu equilíbrio não depende da curvatura membranar, mas sofrem uma modelação estrutural e funcional imposta pela curvatura (ex. proteína cinase C). (Bhatia et al. 2009)

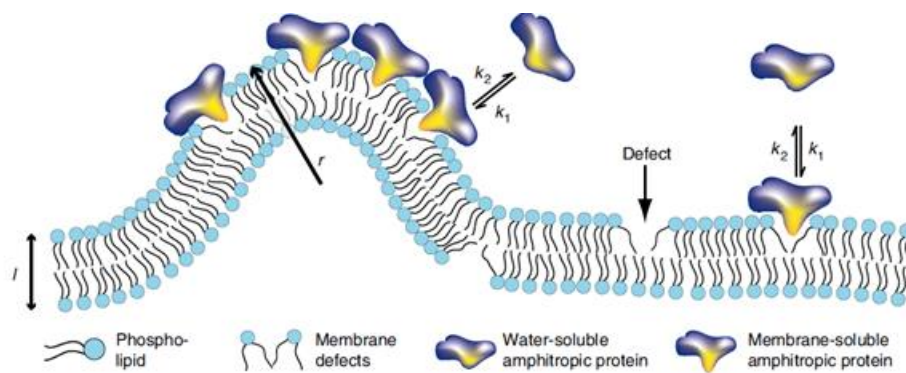


Figura 2- Esquema representativo da ligação em áreas altamente curvadas expondo maior número de defeitos de empacotamento lipídico e consequente aumento de ligação proteica. (adaptado de: Bhatia et al. 2009).

### 1.3 Defeitos de empacotamento lipídico

O conceito de defeito de empacotamento lipídico está inicialmente relacionado com a ideia que todas as membranas biológicas apresentam imperfeições no seu arranjo geométrico, devendo-se isto á variação do teor de lípidos com geometria individual variada, desde uma forma canónica até cilíndrica. (Janmey and Kinnunen, 2006; van der Brinkvan der Laan et al., 2004).

A geometria lipídica depende das cadeias acyl. Uma cadeia oleoyl (C18:1) ocupa um maior volume que uma cadeia palmitoyl (C16:0), pois a dupla ligação induz uma torção no meio da cadeia (figura 3). O defeito no empacotamento lipídico depende então de dois rácios: o rácio entre pequenas e grandes cabeças polares e o rácio entre cadeias acyl saturadas ou insaturadas. (Bigay et al. 2012)

As áreas de curvatura membranar expõe maior número de defeitos de empacotamento lipídico, devido ao esticamento do folheto externo. (fig.2),



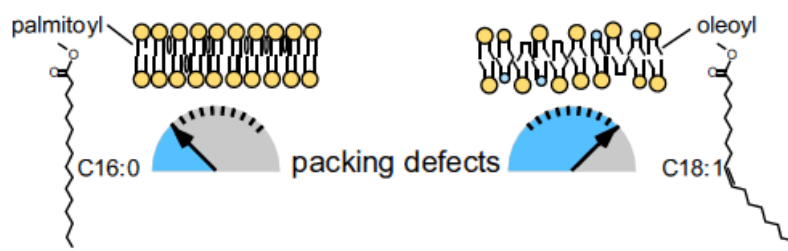


Figura 3- Diferenças entre cadeias lipídicas palmitoyl e oleoyl, a sua geometria membranar, e a sua relação com o aumento de defeitos de empacotamento lipídico. A cadeia lipídica insaturada oleoyl apresenta uma torção no meio da sua cauda hidrofóbica. (adaptado de: Bigay et al 2012)

#### 1.4 Carga Superficial Membranar

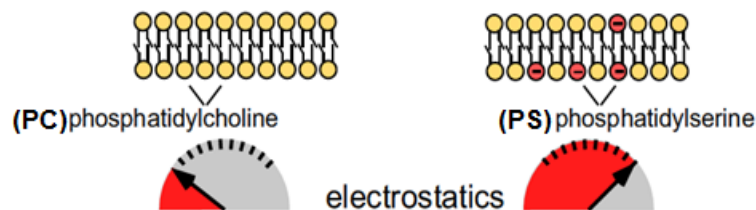
A carga superficial é um fenómeno distinto do potencial transmembranar, sendo esta uma diferença de potencial electrodifusiva, criada por diferenças nas concentrações de iões inorgânicos nas permeabilidades desses iões através da membrana. A carga superficial, contudo, é determinada pelo efeito cumulativo das cargas das cabeças dos lípidos carregados na superfície da membrana. Ambos os grupos funcionais, catiónicos e aniónicos, contribuem para os campos eléctricos criados na superfície membranar. (Vance JE, Steenbergen R., 2005)

Na membrana plasmática, existe uma relativa predominância de espécies aniónicas no folheto interno, concedendo um perfil geral de carga negativa. A membrana apresenta na sua composição dois fosfolípidos monovalentes responsáveis pela carga superficial negativa membranar: a fosfatidilserina (PS) e o fosfatidilinositol (PI).

Apesar de cada uma destas moléculas apenas contribuírem com uma carga unitária, PS e PI representam cerca de 15% e 10% do conteúdo lipídico no folheto interno da membrana

plasmática, respectivamente. Os lípidos zwitterónicos membranares fosfatidilcolina (PC) e fosfatidiletanolamina (PE) contribuem com 25% e 45% e adicionalmente a PS e PI, as espécies polivalentes de PI:- PI(4)P, PI(4,5)P<sub>2</sub> e PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, também contribuem significativamente para a carga superficial.

Estas espécies podem ser segregadas em microdomínios quando ligados a regiões policationicas proteicas, aumentando a sua acumulação local e influência na carga superficial. O efeito gerado na rede pela acumulação de fosfolípidos aniónicos na membrana plasmática é de 105 V/cm<sup>2</sup>, capaz de atrair fortemente proteínas cationicas,



péptidos e iões. (Neil M. et al 2010)

Figura 4- Esquema representativo do aumento das forças electrostáticas pelo aumento do conteúdo de PS numa bicamada lípidica. (adaptado de: Bigay et al 2012)

## 1.5 Ras GTPase

Ras GTPases pertencem á classe proteica das G-proteínas, estando estas envolvidas em diversos processos celulares, tais como o transporte de vesículas, o ciclo celular e tradução de sinal. (Takai et al. 2001) Estas proteínas são activadas com a ligação com Guanina 5'trifosfato (GTP), quando ligadas a Guanina-5'-difosfato (GDP) estabilizam a sua forma inactiva; perante esta característica funcional, elas são designadas como

interruptores GTP-GDP. Como na sua forma activa estas proteínas estimulam ou inibem importantes processos celulares, a sua má regulação encontra-se associada a diversos cancros, onde estas proteínas inactivadas por GDP são normalmente encontradas. (Wittinghofer A.; Waldmann H., 2000)

As 3 isoformas da superfamília Ras são: H-,N- e K-Ras, e estas apresentam diferente sequência de amino ácidos maioritariamente na região hipervariável do C-terminal, onde uma modificação pós-translacional influencia a regulação da ligação a membranas.

Lipidações pós-translacionais por acilação com ácidos gordos, alquilação com motivos prenilos, esterificação com colesterol, e por conjugação com complexos lipídicos glicosilfosfatidinositol (GPI), tipicamente resultam num aumento da afinidade para ligação a membranas, afectando a localização e o funcionamento destas proteínas lipidadas. (Brunsfield 2009). Tanto as modificações pós-translacionais na região hipervariável do C-terminal, como o fluxo de GTP-GDP influenciam a localização e o funcionamento destas proteínas nos diferentes domínios lipídicos. Acredita-se que o tráfico e o transporte de proteínas lipidadas dá-se no domínio designado por líquido ordenado, ou tipicamente conhecido como “*raft* lipídico”. (Prior & Hancock, 2012)

Para quantificar “*in-vitro*” o efeito potencial sinergista na distribuição proteica, combinando a curvatura membranar e os domínios de líquido ordenado foi reportado que o péptido tN-Ras sendo o mínimo motivo da âncora da GTPase N-Ras, contém modificações essenciais para as membranas celulares como também a correcta localização espacial dentro da célula. (Larssen J et al. 2010)

.

## 1.6 PAMAM Geração 6

Dendrímeros poliamidoamina (PAMAM) foram descobertos em 1980 (Tiriveedhi V et al. 2010) e sintetizados e caracterizados pela primeira vez em 1985. (Tomalia et al.) Eles são moléculas altamente catiónicas, monodispersas, hiperramificadas, construídas em bloco por ramos amido aminas. Na estrutura globular um novo par de ramos fornece uma camada adicional á superfície, ou seja, formando uma nova geração. Devido ao seu crescimento exponencial, estes dendrímeros tornam-se bastantes grandes, alcançando na geração 6 o mesmo diâmetro observado em proteínas de tamanho médio (7nm). (Akesson A. Et al. 2012)

Relativamente á sua preparação estes podem ser formados de forma convergente ou divergente, aumentando exponencialmente o número de grupos carregados á superfície molecular. A sua forma depende do número de geração, baixa geração (inferiores á Geração 4), apresentam uma forma elipsoidal e aberta, estruturas porosas, enquanto gerações superiores (G5 e superior) são esféricas e apresentam uma estrutura capsular fechada. Diversas aplicações no campo médico têm sido propostas para a utilização destas moléculas, sendo a de maior importância a entrega de fármacos, para tal efeito estes ou são retidos no interior da “caixa dendrítica” ou formados por ligações covalentes com os grupos terminais de amino, Estes dendrímeros sendo altamente solúveis em água, apresentam a capacidade de transferir fragmentos de DNA, imunoglobulinas e drogas anticancerígenas através da membrana celular. (Tiriveedhi V et al. 2010)

Em geral, todas as macromoléculas capazes de penetrar na membrana celular são catiónicas a pH fisiológico, como tal devido ao seu tamanho relativo e a sua carga, o exacto mecanismo pelo qual estas moléculas conseguem atravessar o interior hidrofóbico da bicamada ainda não se encontra totalmente esclarecido.

Alguns estudos sugerem que dendrímeros PAMAM são internacionalizados nas células através da cavéola ou pelo percurso da claterina, apesar de também poder ocorrer a translação através da membrana sem ajuda proteica. As forças maiores que levam á interacção num sistema de penetração celular são electrostáticas e hidrofóbicas, estas levam eventualmente a um desequilíbrio osmótico. Recentes estudos com vesículas gigantes unilamelares (GUVs) demonstraram que PAMAM geração 6 podem ligar-se eficientemente e mudar a permeabilidade da bicamada, adicionando cargas negativas á membrana podendo fazer aumentar a sua ligação à membrana. (Akesson A. Et al. 2012)

### **1.7 Marcks-ED**

A proteína nativa intracelular Marcks, (myristoylated alanine-rich C kinase substrate) de 87 kDa, é um substrato específico da proteína cinase C (PKC), mediando a sinalização de PKC para uma fosforilação e subsequente a modificação da sua associação com filamentos de actina (F-Actina) e Calmodulina (CaM). PKC encontra-se associada ao ciclo de proliferação celular, onde estudos recentes sugerem que MARCKS pode funcionar como um supressor do crescimento celular (Zhao Ying et al., 2000). MARCKS exerce funções também como a regulação da sinalização da proteína Fosfolípase C e o recrutamento de PIP<sub>2</sub>. (Morton L. et al. 2013)

A proteína MARCKS é requerida também na secreção de mucina (o componente glicoproteico do muco) de células epiteliais. Um método para a sua inibição “*in-vivo*”, permitiria desenvolver novas terapias para o controlo da hipersecreção e ser um marco no tratamento de patologias como asma, bronquite crónica e fibrose cística. (Singer, M et.al, 2004)

MARCKS reconhece os lípidos carregados negativamente (PS) do folheto interno membranar, usando a sua região ED (aa 151-175), sendo esta associação membrana-proteína, um processo reversível quando ligado a Calmodulina (CaM) na presença de cálcio  $\text{Ca}^{2+}$ .

MARCKS-ED (aa 151-175), é um pequeno péptido derivado do domínio efector do substrato myristoylated alanine-rich C-kinase, que selectivamente reconhece superfícies membranares curvas, não só pelo tamanho da curvatura, mas também pela composição lipídica, detectando a carga negativa de PS. Deste modo, a região ED é sensorial de curvatura, e encontra-se estabelecido que esta ligação é conduzida por forças electrostáticas entre os seus resíduos catiónicos (ex. Lisina, Arginina) e os fosfolípidos carregados negativamente PS. O maior número de defeitos de empacotamento lipídico, produzidos pela curvatura membranar foi reportado como o factor responsável para a inserção do resíduo aromático composto por 5 Fenilalaninas (Phe) na bicamada lipídica. (Morton L. et al. 2013)

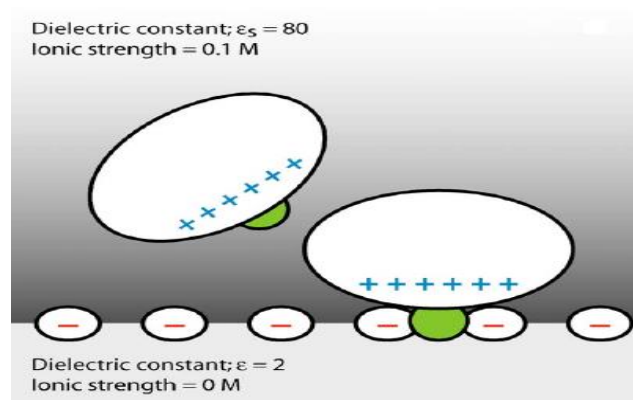


Figura 5- Esquema ilustrativo da influência de forças electrostáticas, na ligação de MARCKS a membranas. (+) resíduos catiónicos, (-) PS, resíduo aromático (esferas verdes). Adaptado de: (Mulgrew-Nesbitt 2006)

### **1.8 As desvantagens da utilização de ensaios de massa para a investigação da ligação de proteínas lipídicas.**

Nas últimas décadas, a maioria dos estudos na ligação de proteínas lipídicas a membranas têm sido efectuados com medidas de espectroscopia de massa. Actualmente dois métodos para medição de ligações proteicas encontram-se bem definidos, o primeiro conhecido como o método de sedimentação e o segundo método de sonda fluorescente. (Johnson J. & Cornell R 1999)

O ensaio por sedimentação usa centrifugações ultra-rápidas para obtenção de “pellets” de vesículas com ligação proteica antes de quantificar a ligação pela técnica SDS-PAGE. Este método apresenta alguns problemas e limitações inerentes. Primeiramente, tanto as vesículas como as proteínas são sensíveis e quando sujeitas a forças de 100000 g podem ser potencialmente danificadas ou pelo menos alterar as suas propriedades de ligação e geometria. Uma vez que este ensaio usa marcação radioactiva como método de detecção, não é possível o acesso à integridade nem das vesículas nem das proteínas. Além disso a pobre detecção limite do SDS-PAGE torna a ligação problemática das proteínas a vesículas numa escala nanométrica, deixando apenas detectáveis afinidades inferiores a 1 $\mu$ M.

O segundo método, é o ensaio baseado na utilização de fluorescência de uma sonda fluorescente bimanlyl sensível ao meio, onde a proteína lipídica marcada com a sonda é incubada nas vesículas, e após a ligação, com a mudança do ambiente, sofre um aumento na sua fluorescência podendo esta ser detectada por espectrofotometria. Este ensaio apresenta deficiências no que diz respeito ao fornecimento de quantificações precisas no fenómeno de inserção de sonda. É de vital importância que o marcador fluorescente sensível ao meio seja colocado na parte proteica que se insere na membrana. Contudo, um

marcador nessa posição pode perfeitamente afectar a natureza da inserção e consequentemente alterar as medições das constantes de ligação.



## **1.9 As vantagens do ensaio de curvatura de lipossomas singulares (SLiC)**

Este ensaio criado por Dimitrios et al., para a avaliação da influência da curvatura membranar e o seu papel na ligação de proteínas lipídicas por inserção de motivos como as hélices anfipáticas, é baseado no procedimento de sedimentação previamente descrito, mas as proteínas e vesículas são centrifugadas enquanto movimentadas num gradiente de sucrose. Para investigar a dependência da curvatura na ligação preparamos populações de vesículas com diferentes tamanhos pelo método de extrusão e validamos o seu tamanho médio por espalhamento de luz dinâmico (DLS).

Todas as técnicas para estudos de ligação de proteínas ou dependência da curvatura em ensaios de massa, apresentam o risco de excluir a média relacionada com a ligação dependente da curvatura, tornando a quantificação precisa deste fenómeno impossível. Os estudos de investigação na área de ligação selectiva de proteínas a membranas curvas, foram efectuadas então usando diferentes populações vesiculares. Estas populações extrusadas com um filtro de 50nm e 100nm, e 100nm e 200nm sobrepõe-se em ~ 70 %. (Figura 6)

Imobilizando vesículas numa superfície de vidro previamente tratado por passivação, de modo a representar um modelo artificial de membranas celulares, e aplicando microscopia fluorescente confocal, é possível monitorizar individualmente cada vesícula, sendo então cada vesícula considerada como uma única experiência e com distinta curvatura. Portanto, no nosso caso a polidespersividade de tamanhos vesiculares é apenas um contributo, pois esta possibilita a análise de todos os diferentes tamanhos vesiculares e curvaturas associadas numa única experiência. O alto rendimento desta técnica permite análises rápidas (min. vs horas) e menos consumo de material. Como foram usados fluoróforos para detectar tanto as proteínas como vesículas, não ficamos limitados pelo elevado limiar de detecção do equipamento SDS-PAGE. Os fluoróforos usados no ensaio não são sensíveis ao meio e o fluoróforo é colocado longe do local de interacção. Por fim, o ensaio possibilita seguir a experiência em directo, adquirindo imagens fluorescentes antes e após a adição de proteínas, permitindo-nos investigar a consequência exacta provocada pela ligação das proteínas às vesículas.

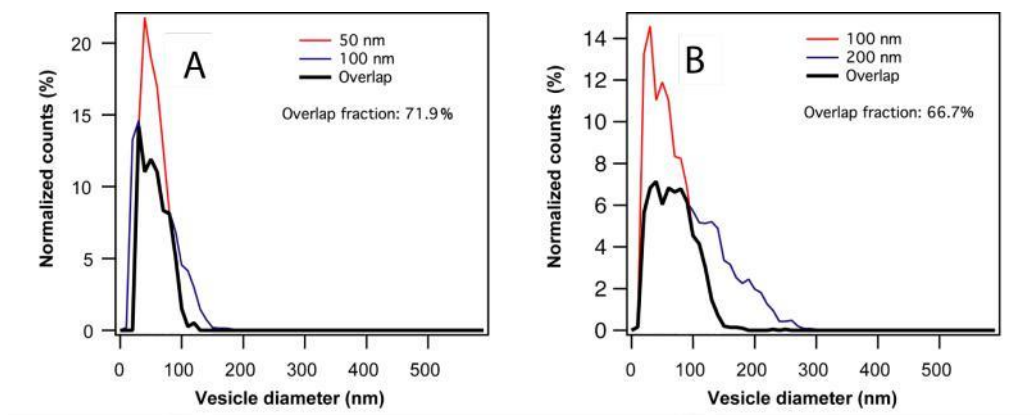


Figura 6 – Distribuição da sobreposição de vesículas, obtidas por extrusão com filtros de vários tamanhos. Uma sobreposição de ~70% em ambos os casos (retirado de: Hatzakis 2009) (A) Comparação entre vesículas extrudadas com filtro de 50nm e 100nm. (B) Comparação de vesículas extrudadas com filtro de 100 e 200nm.

# 2

## **Objetivo**

Neste projecto, pretende-se investigar a um nível singular as propriedades físicas biomembranares e a sua directa influência na associação reversível com biomoléculas. Para o efeito, serão utilizadas biomoléculas com função definida e analisado o comportamento das mesmas quando se manipulam parâmetros importantes associados a biomembranas. Para atingir este objectivo, será utilizado um ensaio “*in-vitro*”, onde lipossomas individuais marcados com sondas fluorescentes e imobilizados numa superfície de vidro são visualizados e fotografados usando microscopia laser confocal. A polidispersividade inerente á preparação lipossómica poderá introduzir grandes erros na média de ligação. Deste modo, foi planeado o uso de pequenas vesículas unilamelares e monitorizado como os parâmetros membranares afectam a ligação de três classes diferentes de moléculas: -Primeiro foi utilizado um péptido lipídico derivado da GTPase N-Ras (tN-Ras), para o estudo da forma da membrana na ligação peptídica; segundo o dendrímero (PAMAM G6) foi utilizado para elucidar o papel desempenhado pelas interacções hidrofóbicas e electrostáticas; por último foi utilizado um péptido derivado da proteína membrana MARCKS (myristoylated alanine-rich C kinase substrate), para o estudo das forças electrostática da rede membrana e a consequente alteração do pH em lipossomas individuais que poderão regular o recrutamento específico de péptidos altamente catiónicos.

# 3

## **Material e Métodos**

### 3.1- Lípidos

**DOPC-** 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, Mw 786, Avanti Polar Lipids (APL)

**DOPS-** 1,2-di-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phospho-L-serine (sodium salt) Mw 810, Avanti Polar Lipids (APL)

**DOPE-cap-Biotina-** 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-(Cap Biotinyl), Mw 1105, APL

**DOTAP-** 1,2-di-(9Z-octadecenoyl)-3-trimethylammonium-propane (chloride salt), Mw 698, Avanti Polar Lipids (APL)

**TopFluor PS-** 1-palmitoyl-2-(dipyrrometheneboron difluoride)undecanoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine (ammonium salt), Mw 929 (APL)

**DOPE-atto655-** 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, Atto-Tec.

### 3.2- Solventes

**CHCl<sub>3</sub>-** Clorofórmio, HPLC grade, Lab-scan Analytical Sciences DMSO

**Dimethyl sulfoxide-** HPLC grade, Lab-scan Analytical Sciences

**CH<sub>3</sub>OH Metanol-** HPLC grade, Lab-scan Analytical Sciences CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH

**Etanol** >99.8% pure, Fluka

**H<sub>2</sub>O MilliQ,-** ultra pure water, 18.2 MΩcm

### 3.3- Proteínas

**Streptavidina-**  $M_w$  53 kDa, Molecular Probes

**Avidina-**  $M_w$  66 kDa, Molecular Probes,

**Neutravidina-** NeutrAvidin® Biotin-binding Protein (Molecular Probes®)

**PLL-g-PEG-** Poly-L-Lysine grafted PEG polymer, PLL(20)-g[3,5]-PEG(2), SurfaceSolutionS

**PAMAM G6-** Generosamente cedido por Anna Akesson.

**T-nRas-** Generosamente cedido por Jannik Larssen, e preparado por Søren Pedersen doutorando do grupo Knud J. Jensen da Universidade de Ciência de Copenhaga.

**Marcks-ED-** comprado a Schafer-N, Lersö Parkalle 42, DK-2100 Copenhaga.

### 3.4- Soluções-Tampão

10 mM PBS buffer, pH 7.4

10 mM PBS buffer, pH 6

10 mM Heppes buffer, pH 7

10 mM K-PBS buffer, pH 7.4

### 3.5- Composições Vesiculares

DOPC 100% (mol.%)

DOPC/DOPS10%,(mol.%)

DOPC/DOPS 25%,(mol.%)

DOPC/DOTAP25%,(mol.%)

DOPE-Atto655/TOPFLUOR.

### **3.6- Composição Lipídica**

As vesículas investigadas neste trabalho foram primeiramente produzidas por bicamadas lipídicas contendo lípidos funcionalizados e carregados. Os constituintes principais usados foram os da rede lipídica neutra DOPC e os negativamente carregados DOPS. As vesículas de carga negativa promovem a repulsão electrostática das proteínas, prevenindo desta maneira a absorção das vesículas á superfície que levam potencialmente á sua deformação e/ou rutura. Adicionalmente a repulsão electrostática entre as vesículas inibe a sua fusão, mais uma vez, assegurando a sua integridade. Para facilitar a imobilização, as vesículas contêm 1% (molar%)DOPE-Cap-biotina, e foram marcadas com 1% (molar%) de DOPE-Atto655, que demonstrou ser bastante foto-estável e bastante resistente ao branqueamento por exposição prolongada.

Várias outras bicamadas lipídicas foram utilizadas neste trabalho, as concentrações das diferentes espécies lipídicas estando descritas na secção 3.5. A concentração do fluoróforo foi sempre mantida abaixo dos 2% em todas as experiências de modo a não perturbar a membrana lipídica.

### **3.7- Preparação de vesículas**

Na preparação de vesículas foi utilizada a mais comum das técnicas, a rehidratação do filme lipídico (Kunding A. et al. 2008). Os lípidos são dissolvidos em clorofórmio e posteriormente colocados no frasco de vidro de 2 mL para obter uma massa total lipídica de 1 mg. O solvente é então lentamente evaporado sobre um fluxo lento de N<sub>2</sub> de modo a criar um fino filme lipídico. De modo a assegurar a remoção total do solvente o frasco de



vidro foi colocado em vácuo durante 4 horas. A camada lipídica foi posteriormente reidratada com D-Sorbitol 100mM “over-night” á temperatura ambiente. A amostra foi sujeita a 10 ciclos de “freeze/thaw” pela sua transferência entre nitrogénio líquido e banhos de água quente e depois as vesículas foram passadas por um extrusor usando filtros de polycarbonato com poros de 80 nm, auxiliado com o operador manual Mini-Extruder(Avanti). Foram retiradas alíquotas de vesículas em fracções de 10 µL e armazenadas a -21°C.

### 3.8- Imobilização

Para assegurar a aquisição de imagens de alta qualidade, as vesículas foram imobilizadas numa superfície, prevenindo desta maneira a sua difusão para fora do volume de detecção. Vários esquemas de imobilização têm sido desenvolvidos e nesta dissertação será usado como base um modelo desenvolvido por Stamou D et al. (Ver 1.9) Neste modelo, vesículas contendo lípidos biotinizados são ligados a Biotina/PLL-PEG-Biotina cobrindo a superfície com um tratamento com neutravidina.

Neste ensaio a imobilização vesicular é controlada por uma impressão de micro contacto. Obtendo uma distribuição aleatória de vesículas tratadas, foi controlada a densidade vesicular á superfície pelo volume adicionado no passo de imobilização.

A densidade óptima é encontrada quando cada vesícula pode ser identificada como entidade única á superfície e a superfície coberta a um nível máximo.

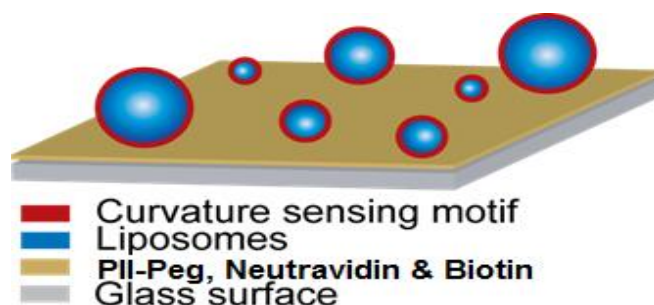


Figura 7- Esquema ilustrativo do modelo de imobilização para o ensaio de lipossomas singulares com curvatura (SLiC).

### **3.9- Preparação da superfície**

As lâminas de vidro foram sujeitas a vários ciclos de sonificação, 3 vezes em 2% Helmanex e lavadas em água MiliQ entre cada ciclo. De modo a remover todo o detergente, as lâminas foram então sonificadas 5 vezes em água MiliQ e finalizando com um ciclo de metanol. As lâminas foram então armazenadas num recipiente de metanol até ao seu uso. Para produzir uma amostra para ensaio, a lâmina foi seca sobre um fluxo de N<sub>2</sub>, tratada por “plasma etch” e colocada numa câmara metálica. Seguidamente foi adicionado 80 µL de Pll-Peg-Biotin (1 g/L, 10:1) e incubado por 30 minutos. Depois de lavadas 10 vezes com 50 µL de tampão PBS 100 mM, foi adicionado 80 µL de Neutravidina (0,1 g/L) e incubado durante 10 minutos. Após outro ciclo de lavagens, um volume seleccionado de vesículas foi adicionado e esperou-se 20 minutos para a sua imobilização. Por último efectuou-se um ciclo de lavagem e a amostra foi então visualizada como referido em 3.14.

### **3.10- Desenvolvimento do ensaio de lipossomas singulares com curvatura**

Isolando vesículas singulares pelo tratamento da superfície por passivação a baixa densidade (Figura 7), e auxiliado por microscopia laser confocal, podemos obter imagens com 10<sup>3</sup> lipossomas com diferentes diâmetros por “frame”. A intensidade total integrada dos lipossomas marcados com sondas fluorescentes na membrana é proporcional á raiz quadrada do seu diâmetro, deste modo é possível calcular o seu diâmetro geralmente entre  $\pm 5$  nm, de acordo com o procedimento de (Kunding et al 2008). Mas também permitindo calcular a quantidade de moléculas marcadas ligadas a cada lipossoma de maneira similar, utilizando imagens num outro comprimento de onda. O rácio dos dois sinais fornece-nos desta maneira, a densidade de moléculas ligadas a lipossomas singulares de diferentes diâmetros e curvaturas.

### **3.11- Adição de moléculas intercalantes.**

As moléculas em estudo foram gentilmente adicionadas á solução na câmara experimental e posteriormente gentilmente mexidas. Todas as moléculas foram dissolvidas previamente em DMSO (99%) e armazenadas a -21°C. Para utilização, as mesmas são previamente descongeladas e adicionadas a 100 µl do volume de solução e rapidamente transferidas para a amostra na câmara. Este procedimento é efectuado o mais rapidamente possível de modo a reduzir a precipitação. Para todas as experiências a concentração final de DMSO foi mantida abaixo de 1%. Subsequentemente á adição, um período de incubação assegura que o equilíbrio seja alcançado, antes da obtenção das fotografias.

Experiências controlo revelaram que as taxas de “*on-rates*” são rápidas, e que as taxas de “*off-rates*” são muito mais lentas em medições numa escala temporal.

### **3.12- Microscopia Laser Confocal**

Foi utilizado a técnica de microscopia laser confocal para observar e fotografar as vesículas fluorescentemente marcadas, pois esta técnica oferece diversas vantagens comparadamente com a microscopia normal de campo grande. O microscópio confocal contém o “*pinhole*” (Figura 8), que remove o sinal fora de foco, reduzindo desta maneira o fundo inespecífico fluorescente das moléculas difusas em solução, fornecendo desta maneira um maior nível sinal-ruído e aumentando a qualidade de imagem.

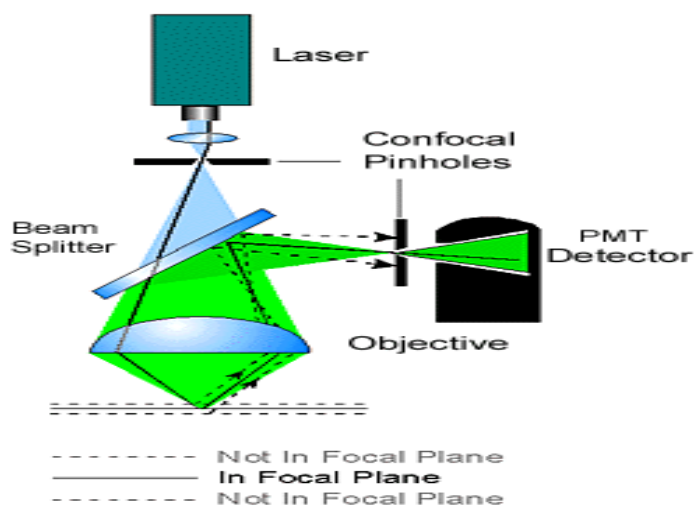


Figura 8- representação esquemático do funcionamento do microscópio laser confocal. Fonte: ([http://www.hi.helsinki.fi/amu/AMU%20Cf\\_tut/cf\\_tut\\_part1-4.htm](http://www.hi.helsinki.fi/amu/AMU%20Cf_tut/cf_tut_part1-4.htm))

### 3.13- Definições de Visualização

Os ensaios foram efectuados num microscópio confocal invertido Leica TCS SP5. Para visualização de alta resolução, foi usado óleo de imersão, objectiva HCL PL APO x100 e uma abertura numérica de 1.4. Os fluoróforos foram visualizados por sequência.

### 3.14- Aquisição de imagem e tratamento dos dados

Como definições requeridas para este ensaio, um fluoróforo é aplicado na membrana e outro na proteína em estudo. A co-localização da intensidade entre os dois marcadores está associada à intercalação da proteína com a membrana. A densidade da ligação proteica pode então ser calculada pois a sua intensidade é directamente proporcional ao número de moléculas e a intensidade vesicular é directamente proporcional á área de superfície. (Figura 9)

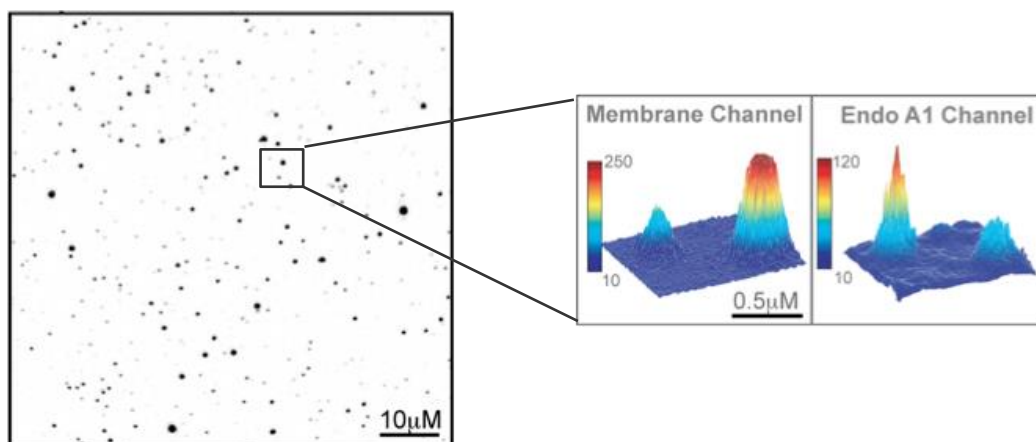


Figura 9- Esquema da obtenção e representação das intensidades dos sinais provenientes do canal vesicular e do canal proteico.

A membrana vesicular foi marcada com DOPE-Atto655 (Molecular probes), enquanto o material proteico foi marcado com fluoresceína, topfluor ou Alexa488. Usando um modo bi-canal, foi possível visualizar sequencialmente os dois diferentes fluoróforos e evitar o fenómeno de “*crosstalk*”. A visualização da superfície funcionalizada resultou em  $\pm 250$  vesículas por imagem, onde cada vesícula representa um ponto limite de difracção, obtida com uma profundidade de 16 bits. A imagem contém deste modo 2048 x 2048 pixéis e uma área constitutiva de 31  $\mu\text{m}$  x 31  $\mu\text{m}$ . (Suplemento1).

O canal de Atto655 é usado para fazer um rastreio das vesículas e para otimizar a focagem, antes da obtenção de fotografias. Atto655 é um fluoróforo bastante foto-estável mesmo com alta excitação pelo laser de 594 nm.

Extensos trabalhos foram desenvolvidos dentro do nosso grupo de trabalho de modo a obter um procedimento automatizado de análise de imagem. O procedimento actual utilizado com o Igor Pro permite tratar uma considerável quantidade de imagens de microscopia de fluorescência numa escala temporal de horas. O princípio básico por detrás da análise automatizada de imagens é o conceito de co-localização, quando se carregam duas imagens sequenciais obtidas num procedimento de rotina, uma de cada canal fluorescente, da mesma área de amostra. O programa regista então as imagens para obtenção de intensidade de sinal acima de um valor limiar predefinido. Encontrando o tal sinal, o programa aplica uma função Gaussiana do perfil de intensidade e integra-os na

área abaixo da Gaussiana. Esta operação fornece a intensidade integrada de cada partícula, que é usada para a análise de dados nesta dissertação. O processo é efectuado em ambas as imagens e as posições XY do centro de massa da Gaussiana aplicada de cada canal é então comparada. Se elas se co-localizarem dentro de uma distância de pixel definido pelo usuário será incluída como uma ligação membrana-proteína. É importante denotar que a função Gaussiana se enquadra em todo o perfil de intensidade, mesmo na parte abaixo do limiar aplicado. De maneira a assegurar que todos os artefactos e sinais oriundos do ruído são eliminados, diferentes parâmetros filtrativos foram aplicados á rotina. Um limiar de intensidade foi usado para excluir os sinais de ruído indesejados, isto significando que apenas partículas com intensidade abaixo deste limiar vão ser consideradas na Gaussiana. Contudo, o aparecimento de partículas que apresentam pixéis com intensidade acima do limiar, leva a rotina a aplicar uma função Gaussiana para todo o perfil de intensidade, e não só acima do limiar aplicado. Esta é uma característica deveras importante, uma vez que isso significa que não apresenta a tendência de exclusão das intensidades integradas das partículas, pela aplicação de um limiar. Servindo este limiar meramente como uma ferramenta para a localização das partículas e não incutir erros sistemáticos impostos pelo utilizador no tratamento dos dados.

Outro filtro utilizado para excluir o ruído é a área mínima de pixel por partícula. Este valor de exclusão permite que apenas partículas contendo um alto número de pixeis adjacentes sejam então localizadas pela rotina, filtrando pequenos ajuntamentos de ruido. Nos resultados aqui apresentados, para imagens de 2048 x 2048 pixeis, a área mínima de pixel por partícula de acordo com o sistema e a experiência, foi sempre de 25 pixéis. Como apenas queremos investigar vesículas, que se encontram intactas e esféricas, foi utilizado um valor máximo que permite a aplicação de uma Gaussiana linear por partícula para desviar de uma Gaussiana perfeita. Permitindo um desvio máximo de 25%, descriminamos e excluimos partículas que não apresentem perfis de intensidade correspondentes a vesículas intactas. Por último aplicamos um filtro elipsóide que exclui partículas que não se apresentam esféricas. Para cada partícula, dois diâmetros perpendiculares são divididos e um valor elíptico entre 0 e 1 é calculado. Para uma esfera perfeita o valor será de 1, e tendo isto em conta aplicamos um valor mínimo aceitável. Além de excluir vesículas não

esféricas, o filtro elipsóide também ajuda a excluir vesículas que estão muito próximas da rotina.

Foi feito um grande esforço neste trabalho para implementar os valores mais apropriados aos filtros de rotina. Perdendo estes filtros, mais ruído e artefactos seriam integrados, mas filtros muito agressivos resultariam na exclusão do sinal real proveniente das pequenas partículas. Como ferramenta para a avaliação automatizada de tratamento de dados, o processo de rotina está equipado com imagens de limiar otimizado, onde se pode seguir directamente as partículas que são incluídas e excluídas. Usando esta ferramenta, as definições óptimas são aquelas em que são incluídas todas as partículas esféricas e não as sobreexpostas, e todos os ruídos e partículas de forma estranha sejam excluídas. Para verificar isso, 10% das menores e das maiores vesículas co-localizadas de todos os ensaios são verificadas manualmente utilizando a função zoom no programa Imagem J.

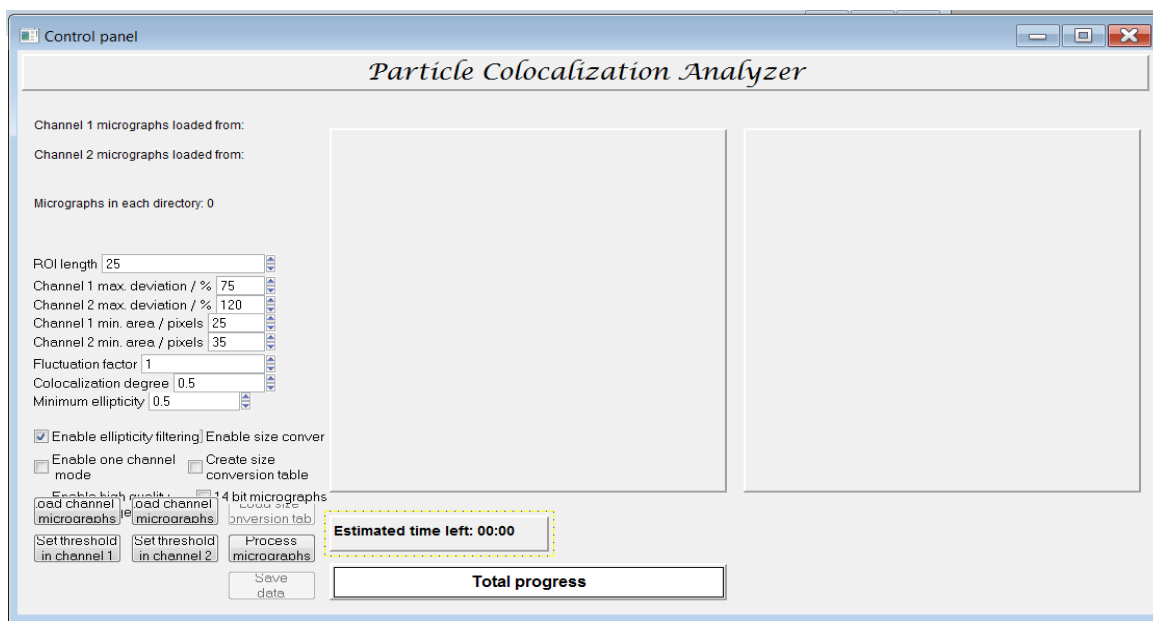


Figura 10- Representação do painel de controlo do "Master Particle Analyzer" do Igor Pro com os valores filtrativos utilizados.



### 3.15- Controlos Microscópicos

O ensaio lipossómico singular apresentado neste trabalho foi extensivamente testado e numerosos controlos foram efectuados. Especialmente foi importante verificar que os resultados não foram enviesados simplesmente pela maneira como foi medida a ligação dependente da curvatura. Respeitando este preceito foi muito importante confirmar que as definições de imagem para aquisição sequencial não transportariam artefactos nos nossos resultados. Para isso procedemos a três controlos experimentais:

- Linearidade do “*gain*”
- Linearidade do “*offset*”
- Traço do branqueamento do fluoróforo (Texas Red)

#### 3.15.1- Linearidade do “*Gain*”

Todo o trabalho apresentado nesta tese é baseado em medições de intensidades para o cálculo de densidades. Se a intensidade de saída do tubo foto multiplicador (PMT) não for linear em relação ao aumento de voltagem, isto irá afectar o cálculo das densidades. As densidades são provenientes da divisão de dois valores de intensidade dos dois canais de gravação. As definições de cada canal são individualmente optimizadas para um sinal óptimo em relação aos níveis de ruído. Além disso os dois canais podem ser visualizados com o ganho do PMT a diferentes voltagens e a não linearidade do ganho pode potencialmente influenciar as medições.

Contudo, foi conduzida uma experiência de controlo visualizando vesículas DLPC/PG marcadas com 1% Texas Red com definições microscópicas similares comparadas à experiência de intercalação. Deste modo, visualizando a mesma área da amostra enquanto se variava o ganho do PMT. Localizando as partículas usando o programa de rotina Igor Pro, possibilitou integrar a intensidade de cada partícula individual com diferentes ganhos.

### **3.15.2- Linearidade do “Offset”**

O microscópio confocal fornece também a oportunidade de variar a janela de detecção pelo ajuste do “offset”. Foi tido sempre em consideração a linearidade do “offset” como já foi explicado para o ganho. Além disso, foram executadas as mesmas experiências de controlo, observando a mesma área enquanto se variava o “offset”, assegurando que o fundo se encontrava na janela de detecção. Mais uma vez, localizando as partículas usando o Igor Pro, foi possível comparar a mesma partícula com diferentes “offsets”. Sendo uma evidência que os “offsets” apresentam uma linearidade perfeita não sendo um obstáculo aquando a aquisição de imagens.

### **3.15.3- Traço do Branqueamento do Fluoróforo Vesicular (Texas Red)**

Para assegurar que a imagem não sofreria um branqueamento significativo no sinal obtido no canal vesicular, é extremamente importante o tempo de exposição para excitação antes de fotografar, ex. tempo de focagem, foi mantido o menor possível de modo a evitar a perda de intensidade e influenciar nos resultados. O teste de foto-estabilidade foi efectuado com Texas Red. Foi obtido o traço de branqueamento com o dobro da potência laser usado nas experiências. O fluoróforo vesicular usado neste trabalho foi o Atto655 apresentando foto-estabilidade semelhante. O traço de branqueamento mostra que mesmo após 100 fotografias com alta intensidade laser, se observa apenas um decréscimo de ~20 %. O tempo necessário entre fotografias para se observar um decréscimo da intensidade, mesmo para alta intensidade laser (dobro da intensidade usada nos ensaios), é muito mais moroso que o tempo máximo que cada área vesicular é fotografada e focada. Consequentemente concluiu-se que a gravação de intensidades das vesículas é fiável e não necessita de correcção.

### **3.16- Calibração do tamanho vesicular**

De modo a adquirir o objectivo de correlacionar a intercalação anfifílica com a curvatura membranar, é necessário saber o tamanho individual vesicular. No nosso grupo foi desenvolvido um procedimento para a determinação do tamanho vesicular baseado na intensidade da fluorescência dos componentes lipídicos marcados com sondas fluorescentes. O método quantifica o diâmetro de vesículas singulares abaixo da resolução óptica com uma precisão  $\pm 5$  nm. De modo a calibrar o tamanho das vesículas foram usadas as técnicas de microscopia laser confocal combinada com o espalhamento dinâmico de luz (DLS). Assumindo que o fluoróforo é distribuído igualmente em todas as vesículas, a intensidade integrada será proporcional ao número de moléculas fluorescentes e a área superficial. Isto significa que o diâmetro das vesículas é igual à raiz quadrada da intensidade, multiplicada pelo factor de correcção (C).

A intensidade integrada gravada das vesículas pode então ser comparada para calcular o raio. Para o efeito, foi preparada uma amostra de referência, onde as vesículas da população em estudo foram extensivamente sujeitas a ciclos de extrusão utilizando um filtro com um poro de 50nm. Este poro irá tentar minimizar o grau de polidispersividade e o raio do tamanho das vesículas entre os 50nm. A amostra de referência é então visualizada com as mesmas definições microscópicas usadas para as experiências. Seguidamente, a amostra referência é investigada usando DLS, fornecendo a distribuição do tamanho das vesículas. A média da distribuição pode então ser correlacionada com a média da intensidade integrada de todas as vesículas da medição microscópica. Desta maneira o factor de correcção é calculado e então usado para converter a intensidade em diâmetro para todas as experiências. A limitação deste método encontra-se no facto que cada factor de correcção pode apenas ser usado uma preparação específica de vesículas visualizadas com as mesmas definições. Contudo, este procedimento fornece a possibilidade de comparar diferentes preparações de vesículas, sendo uma poderosa ferramenta para a investigação dos efeitos da dependência da curvatura membranar.

# 4

## **Resultados e Discussão**

#### 4.1 tN-RAS um sensor de curvatura

Neste ensaio foi testada a ligação da mínima âncora de N-RAS, tN-RAS a locais da membrana exibindo maior curvatura. Para tal efeito foi produzida uma população polidispersa de vesículas lipídicas, numa relação 90:10 (em mol%) de DOPC:DOPS, de modo a simular um ambiente eléctrico mais próximo da membrana celular nativa.

No gráfico da Figura 11, podemos observar que vesículas de menor diâmetro exibem uma maior densidade de tN-Ras.

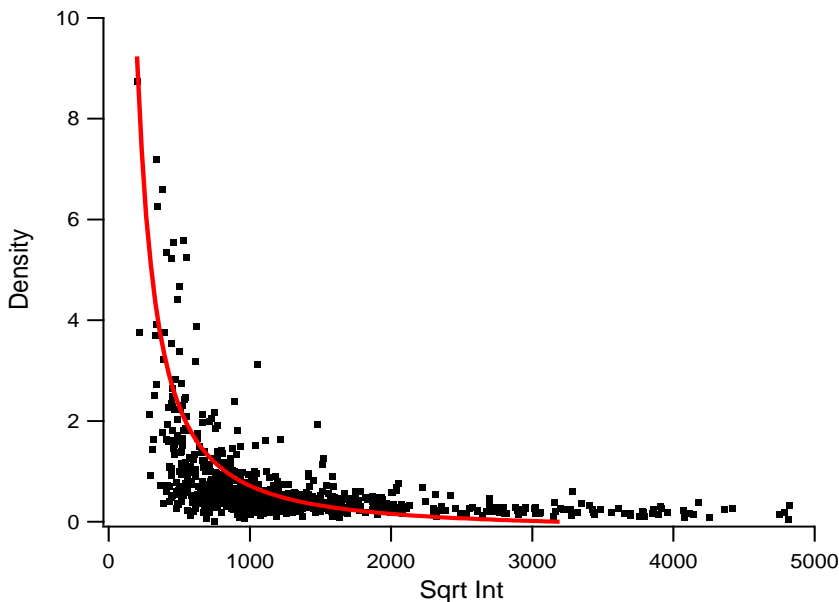


Figura 11- Representação gráfica da densidade (a.u.) de tN-RAS em relação ao seu diâmetro, estimado pela raiz quadrada da intensidade.

Na Figura 12, a representação dos resultados num gráfico com uma escala logarítmica, originou um declive de  $-0,93 \pm 0,03$ , indicando que tN-RAS é um bom sensor\* da curvatura membranar e registasse uma co-localização de ~41%, onde 41% das vesículas apuradas pelo programa “Master Particle Analyzer” do Igor Pro se encontram ligadas ao péptido tN-RAS. Neste primeiro ensaio experimental foi também efectuado a calibração

do tamanho por DLS e obtiveram-se aproximadamente os mesmos valores de declive e co-localização. Como o tamanho vesicular individual obtido por DLS é aproximado do estimado pelo cálculo da raiz quadrada da intensidade, assumimos que o método estimativo fornece uma boa aproximação ao tamanho real, não sendo necessário a calibração de tamanho por DLS nos restantes ensaios experimentais.

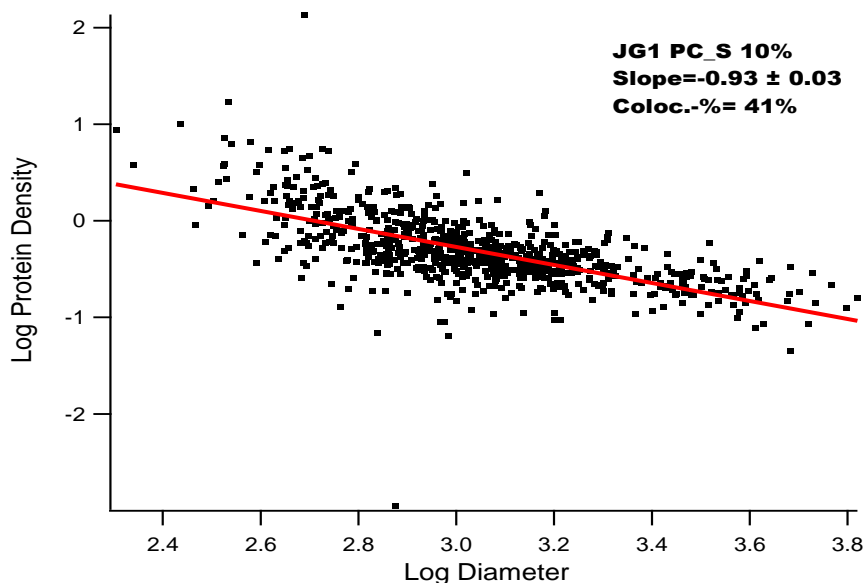


Figura 12- Representação gráfica logarítmica da densidade proteica de tN-RAS em relação ao diâmetro.

## 4.2 Grau de (In)homogeneidade

Neste ensaio experimental foram produzidas vesículas marcadas com dois fluoróforos com espectros de excitação e emissão distintos, nomeadamente, Atto655 e o TOPFLUOR PS®. A composição lipídica utilizada para a formação das vesículas foi de DOPC/DOPS/DOPE-cap-Biot/Dope-Atto655/TOPFLUOR num rácio 73/24/1/1/1 (em mol%) e suspensos num tampão de 10mM PBS pH 7,4.

O grau de (In)homogeneidade foi calculado pela fórmula,  $DI = \sigma/\mu$  apresentando uma média de  $0,26 \pm 0,06$ .

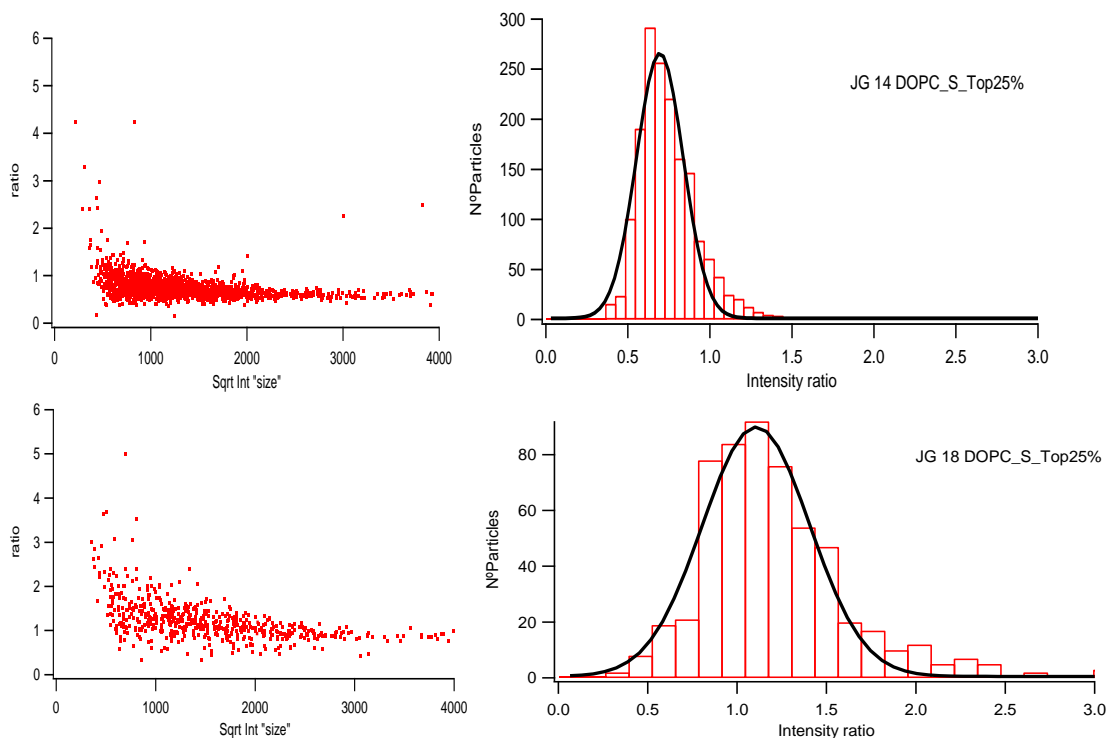


Figura 13- Resultados obtidos no cálculo do grau de inhomogeneidades da bicamada lipídica usando vesículas bimar cadas fluorescentemente com Atto655 e TOPFLUOR PS. (A) Relação entre o rácio de distribuição e o tamanho da vesícula. (B)

### 4.3 PAMAM Geração 6

De modo a estudar o efeito da influência da carga da rede membranar na colocação de PAMAM G6, foram sintetizadas diferentes vesículas com diferentes quantidades de PS:

- DOPC100% (mol. %)
- DOPC/DOPS 90:10% (mol. %)
- DOPC/DOPS 75:25% (mol. %)
- DOTAP 25% (mol. %) (positivamente carregado)

Todos as populações vesiculares foram suspensas em 10mM PBS pH 7,4 e processadas de igual maneira.

A concentração final de PAMAM G6 dentro da câmara em todos os ensaios foi de 10nM.

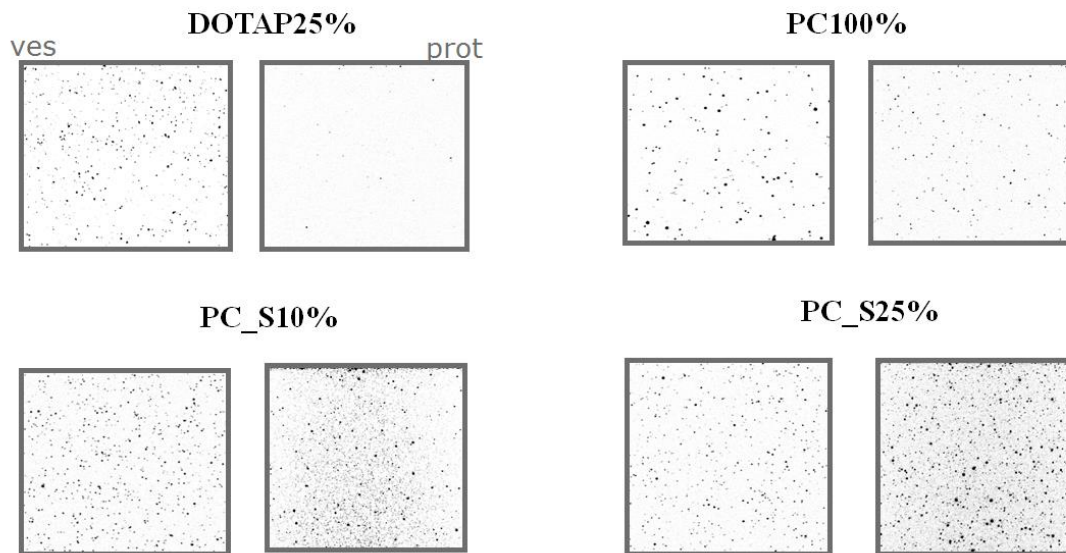


Figura 14- Micrografias dos canais microscópicos evidenciando as populações vesiculares de diferentes teores lipídicos (ves) e a acumulação de PAMAM G6 (prot).

Inicialmente com a obtenção de micrografias (Figura 13), podemos observar uma maior acumulação do dendrímero com o consequente aumento da carga de rede no folheto externo da vesícula, neste ensaio foram testadas vesículas DOTAP25% carregadas positivamente, contribuindo como um teste de controlo negativo, onde se observa uma menor densidade no canal proteico devido possivelmente á repulsão do dendrímero altamente catiónico.

Seguidamente, foi processada a imagem em IGOR pro (Figura14), onde se pode observar um aumento percentual da co-localização e uma diminuição do declive paralelamente ao aumento da concentração molar do lípido carregado negativamente (PS).



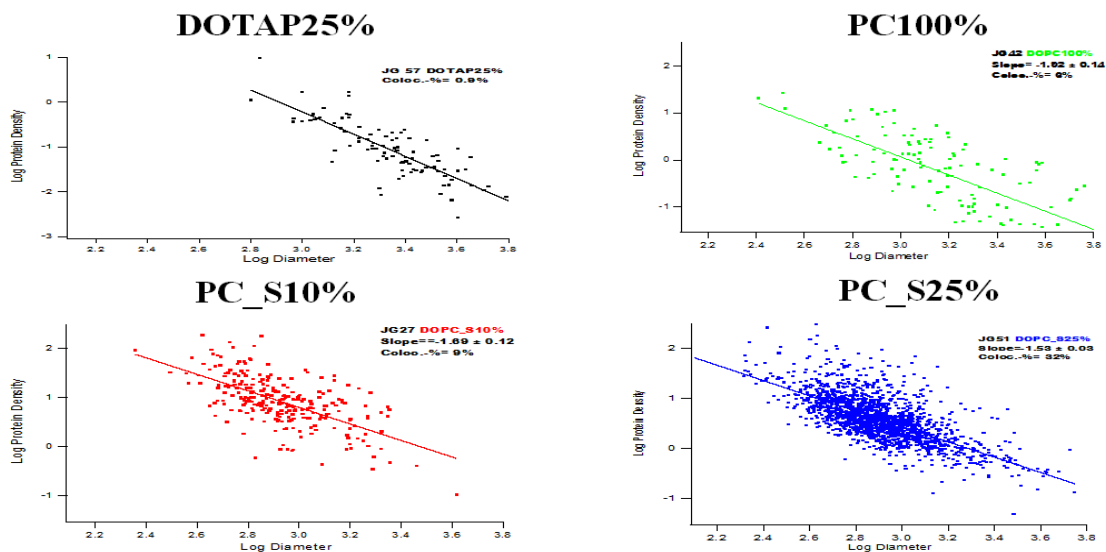


Figura 15- Representação gráfica logarítmica dos resultados obtidos na co-localização de PAMAM G6 a vesículas com diferentes teores lipídicos. DOTAP25% representa um controlo positivo.

Colocando numa tabela a média dos valores obtidos (Figura 15), observamos que a adição de PS, aumentando consequentemente a carga eléctrica negativa vesicular, reduz o processo de sensoriar por parte do dendrímero, como é observado através do decréscimo do declive, mas provoca um acentuado aumento da co-localização, sugerindo fortemente que as forças electrostáticas representam um papel importante no processo de ligação por parte do dendrímero

<b>Colocalização</b>						
<b>Declive</b>			<b>Vesicular%</b>			
	<b>Media</b>	<b>SEM</b>	<b>Media</b>	<b>SEM</b>	<b>NºExp.</b>	<b>Pts</b>
<b>Tap25%</b>	-2.07	0.19	4.1	1.1	4	272
<b>PC100%</b>	-1.95	0.19	8	1.2	3	420
<b>PC_S10%</b>	-1.72	0.19	13.2	1.9	4	1500
<b>PC_S25%</b>	-1.4	0.08	33.5	5	9	4484

Figura 16- Relação média entre os valores obtidos para o declive e a co-localização percentual de PAMAM G6 nas diferentes populações vesiculares.

#### 4.4 MARCKS-ED e MARCKS mut1

As últimas moléculas utilizadas para aferir o papel desempenhado pelas forças electrostáticas foram o MARCKS-ED e MARCKS mut1, inicialmente de modo a excluir a hipótese destes pequenos péptidos penetrarem o interior vesicular, foram produzidos GUVs e fotografados.

Nas micrografias (Figura 16), podemos observar uma distribuição homogénea dos segmentos proteicos em todo o plano de focagem, mas sem sinal no interior vesicular sugerindo que o péptido não apresenta a habilidade de penetrar o interior vesicular, usando a plataforma IMAGE J, foram isolados, ampliados e traçados um perfil energético de uma vesícula isolada e tendo sido observado uma diminuição drástica da intensidade

de sinal emitida pelo fluoróforo do exterior para o interior vesicular. O interior apresenta no entanto um pequeno sinal referente ao ruído implícito no sistema.

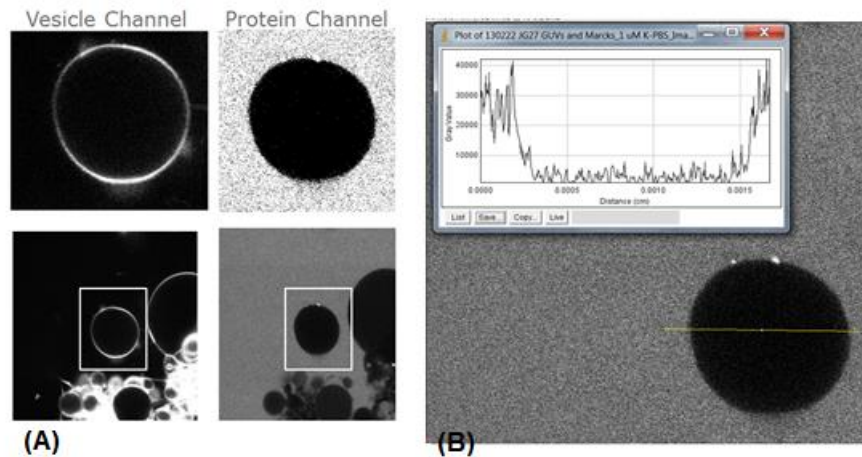


Figura 17- Fotografias (A) GUVs no canal vesicular, e de MARCKS-ED no canal proteico, obtidas por microscopia laser confocal; (B) Análise do perfil energético usando o programa ImageJ

Excluindo esta possibilidade, foram então produzidos dois tipos distintos de SUV's , o primeiro tipo apresentando carga neutra formado por DOPC100% e um de carga negativa DOPC:S25%, na optimização do sistema o Tampão usado foi o 8.1 mM  $K_2HPO_4$ , 1.9mM  $KH_2PO_4$ , pH 6, a câmara de imobilização foi passivada com Avidina, positivamente carregada, as vesículas e os péptidos incubados inicialmente em Eppendorf e adicionados 0,3 $\mu$ L posteriormente á câmara; todo este processo de optimização foi realizado com o intuito de reduzir a ligação não específica, devida á alta reactividade e pequena dimensão do péptido em causa.

A concentração final de MARCKS-ED na câmara é de 37,5 nM

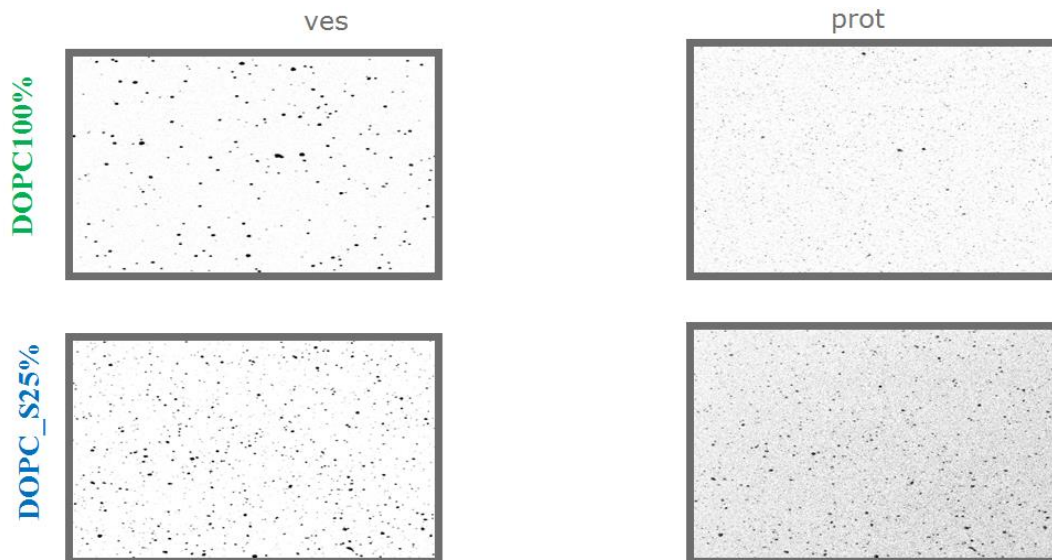


Figura 18- Micrografias dos canais microscópicos evidenciando as populações vesiculares de diferentes teores lipídicos (ves) e a acumulação de MARCKS-ED (prot).

Observando um caso das micrografias obtidas (imagem 17), podemos observar neste caso que também o aumento da concentração no canal proteico consequentemente com o aumento de carga negativa membrana DOPC100%  $\rightarrow$  DOPC:S25%.

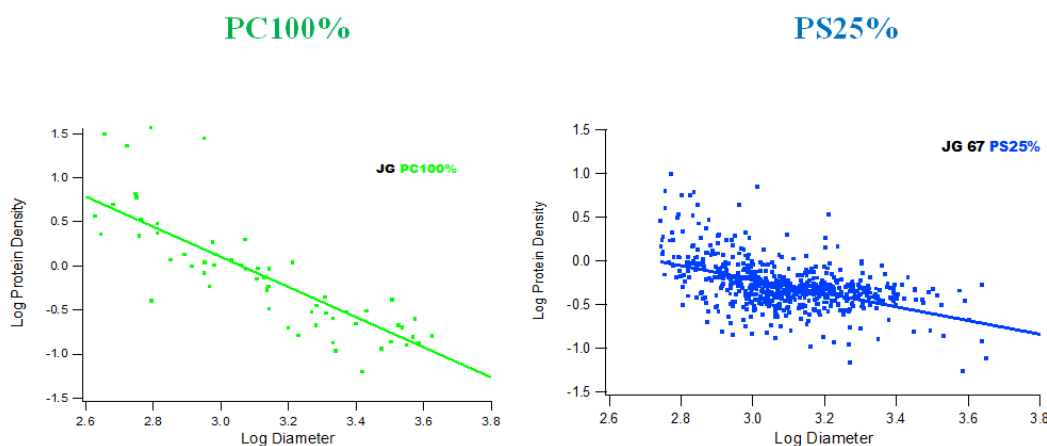


Figura 19- Representação gráfica logarítmica dos resultados obtidos na co-localização de MARCKS-ED a vesículas com diferentes teores lipídicos

No gráfico da figura 18, os resultados evidenciam um aumento significativo na co-localização e uma diminuição do declive, elucidando que também Marcks-ED é influenciado por forças electrostáticas.

Observando a tabela da figura 19, o aumento da carga de membrana em 25% mol de PS, induz uma perda da capacidade de sensoriar por parte do péptido, diminuindo o declive de -1.74 (excelente sensor) para -0,69 (fraco sensor), mas a co-localização é ~3x superior, consolidando a ideia que as forças electrostáticas da rede membranar têm uma grande influência no processo.

Declive			Coloc. %			
	Avr	SEM	Avr	SEM	NºExp.	Pts
<b>0%</b>	<b>-1.74</b>	<b>0.05</b>	<b>9</b>	<b>1.4</b>	<b>4</b>	<b>638</b>
<b>25%</b>	<b>-0.69</b>	<b>0.05</b>	<b>33</b>	<b>3.8</b>	<b>5</b>	<b>3805</b>

Figura 20 - Relação média entre os valores obtidos para o declive e a colocação percentual de MARCKS-ED nas diferentes populações vesiculares.

Na experiência final, Marcks mut1 foi testado, usando todo o mesmo procedimento, e observando o gráfico da figura 20 obtido:

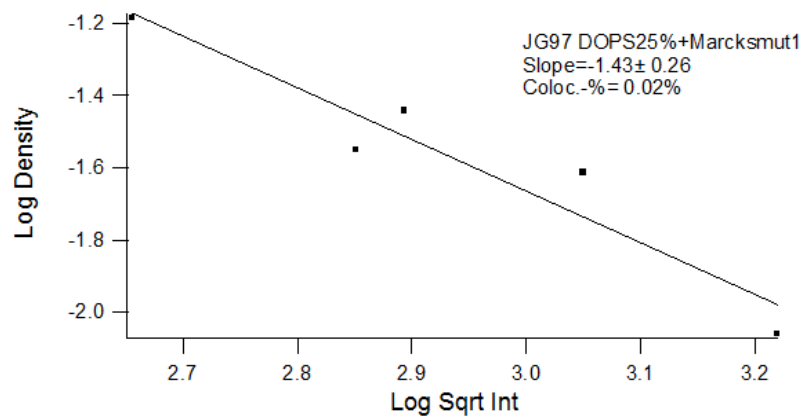


Figura 21- Representação gráfica logarítmica dos resultados obtidos na co-localização de MARCKS mut1 em vesículas DOPS25%.

Podemos inferir que a colocalização em DOPC:S25% sofre uma drástica diminuição de 30% (MARCKS-ED) para 0,02% (MARCKS mut1).

Em DOPC100% no caso de Marcks mut1, não apresentou qualquer partícula co-localizada.

# 5

## **Conclusões e perspectivas futuras**

Relativamente ao processo técnico pode concluir-se que a técnica de análise, nomeadamente SLiC, apresentou grandes vantagens no estudo ao nível singular molecular, no entanto devido a natureza nanoscópica das partículas, exige grande destreza por parte do utilizador sendo um processo minucioso de optimização. A tendência das partículas se ligarem de forma não específica, o ruído residual provocado pelo sistema e as limitações do microscópio para visualização deverão sofrer melhoramentos.

Relativamente aos resultados experimentais produzidos nesta dissertação permite concluir que o grau de (in)homogeneidade em ambas as experiências foi de  $\sim 0.26$ , sendo este valor 3x superior ao valor médio de referência obtido no trabalho “Observation of Inhomogeneity in the Lipid Composition of Individual Nanoscale Liposomes” do meu tutor Jannik Larssen. Assim posso concluir que os lipossomas formados não apresentam homogeneidade na composição lipídica, podendo isto influenciar a eficiência de ligação das proteínas a membranas, levando a implicações directas das densidades proteicas medidas á nanoescala.

Relativamente ao dendrímero Pamam G6, posso concluir que a adição de lípidos negativos (PS) nas vesículas, reduz por um lado a capacidade de sensoramento, por outro lado aumenta o número de partículas co-localizadas com as vesículas, sugerindo que a rede energética membranar vesicular influencia este processo de ligação.

Por último, nas experiências com MARCKS-ED, é possível concluir que MARCKS-ED não penetra o citosol em vesículas gigantes unilamelares (GUV's).

Vesículas pequenas unilamelares (SUV's) exibem um aumento de co-localização com o aumento do teor em PS, mas apresentam inversamente a perda de sensoramento, levando a concluir a mesma influência da rede energética como no caso de PAMAM G6.

Usando o MARCKS mut1, sintetizado sem os resíduos aromáticos para estabilizar os defeitos do empacotamento lipídico, perde-se radicalmente a habilidade de se ligar a nanovesículas, com esta observação sendo possível propor que a força electrostática influencia o sensoramento da curvatura de membrana por péptidos carregados, mas



também que a ligação depende fortemente na estabilização dos defeitos de empacotamento lipídico pelos resíduos aromáticos.

De um modo mais geral pode-se concluir que são vários os parâmetros físico-químicos associados a membranas que conduzem e influenciam o sensoramento e a ligação de moléculas em vesículas num sistema “in-vitro”. Com a evolução técnica e novos aprofundados estudos na área da nanotecnologia e nanomedicina será possível avaliar mais detalhadamente a influência individual de cada um dos parâmetros e a sua simbiose em todo o processo biológico de ligação. Deste modo e sendo um objectivo futuro para o seguimento deste trabalho de investigação, será possível criar um “nanochip” que separe biomembranas pelas suas características mais vincadas, como a carga da rede membranar, o seu tamanho e curvatura associada, a sua forma e a sua composição lipídica. Avanços nesta área possibilitarão também um conhecimento profundo para o desenvolvimento de novas ferramentas na área da saúde, como a produção de nanotransportadores para distribuição de fármacos por sensoramento de alterações na natureza lipídica celular, e novos métodos de regulação de proteínas e/ou péptidos ligados a processos patológicos.

# 6 Bibliografia

- Ahearn, I. M., Haigis, K., Bar-Sagi, D., & Philips, M. R. (2012). Regulating the regulator: post-translational modification of RAS. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(1), 39–51. doi:10.1038/nrm3255
- Åkesson, A., Lundgaard, C. V., Ehrlich, N., Pomorski, T. G., Stamou, D., & Cárdenas, M. (2012). Induced dye leakage by PAMAM G6 does not imply dendrimer entry into vesicle lumen. *Soft Matter*, 8(34), 8972. doi:10.1039/c2sm25864a
- Andressen, C., Bliimcke, I., & Celio, M. R. (1993). Cell & Tissue Review article Calcium-binding proteins : selective markers of nerve cells, 181–208.
- Antonny, B. (2012). Review Curvature , Lipid Packing , and Electrostatics of Membrane Organelles : Defining Cellular Territories in Determining Specificity.
- Arbuzova, a, Wang, L., Wang, J., Hangyás-Mihályné, G., Murray, D., Honig, B., & McLaughlin, S. (2000). Membrane binding of peptides containing both basic and aromatic residues. Experimental studies with peptides corresponding to the scaffolding region of caveolin and the effector region of MARCKS. *Biochemistry*, 39(33), 10330–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10956022>
- Bhatia, Vikram K, Madsen, K. L., Bolinger, P.-Y., Kunding, A., Hedegård, P., Gether, U., & Stamou, D. (2009). Amphipathic motifs in BAR domains are essential for membrane curvature sensing. *The EMBO journal*, 28(21), 3303–14. doi:10.1038/emboj.2009.261
- Bhatia, Vikram Kjøller, Hatzakis, N. S., & Stamou, D. (2010). A unifying mechanism accounts for sensing of membrane curvature by BAR domains, amphipathic helices and membrane-anchored proteins. *Seminars in cell & developmental biology*, 21(4), 381–90. doi:10.1016/j.semcdb.2009.12.004
- Bigay, J., & Antonny, B. (2012). Curvature, lipid packing, and electrostatics of membrane organelles: defining cellular territories in determining specificity. *Developmental cell*, 23(5), 886–95. doi:10.1016/j.devcel.2012.10.009
- Caillard, O., Moreno, H., Schwaller, B., Llano, I., Celio, M. R., & Marty, a. (2000). Role of the calcium-binding protein parvalbumin in short-term synaptic plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(24), 13372–7. doi:10.1073/pnas.230362997
- Cates, M. S., Teodoro, M. L., & Phillips, G. N. (2002). Molecular mechanisms of calcium and magnesium binding to parvalbumin. *Biophysical journal*, 82(3), 1133–46. doi:10.1016/S0006-3495(02)75472-6
- Chin, D., & Means, a R. (2000). Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends in cell biology*, 10(8), 322–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10884684>

- Christensen, S. M., & Stamou, D. (2007). Surface-based lipid vesicle reactor systems: fabrication and applications. *Soft Matter*, 3(7), 828. doi:10.1039/b702849k
- Feng, Y., Li, J., Zhou, W., Jia, Z., & Wei, Q. (2012). Identification of the critical structural determinants of the EF-hand domain arrangements in calcium binding proteins. *Biochimica et biophysica acta*, 1824(4), 608–19. doi:10.1016/j.bbapap.2012.01.005
- Furse, S., Brooks, N. J., Seddon, A. M., Woscholski, R., Templer, R. H., Tate, E. W., ... Ces, O. (2012). Lipid membrane curvature induced by distearoyl phosphatidylinositol 4-phosphate. *Soft Matter*, 8(11), 3090. doi:10.1039/c2sm07358g
- Gambhir, A., Hangyás-Mihályné, G., Zaitseva, I., Cafiso, D. S., Wang, J., Murray, D., ... McLaughlin, S. (2004). Electrostatic sequestration of PIP2 on phospholipid membranes by basic/aromatic regions of proteins. *Biophysical journal*, 86(4), 2188–207. doi:10.1016/S0006-3495(04)74278-2
- Gerke, V., Creutz, C. E., & Moss, S. E. (2005). Annexins: linking Ca<sup>2+</sup> signalling to membrane dynamics. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(6), 449–61. doi:10.1038/nrm1661
- Goldenberg, N. M., & Steinberg, B. E. (2010). Surface charge: a key determinant of protein localization and function. *Cancer research*, 70(4), 1277–80. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2905
- Golebiewska, U., Gambhir, A., Hangyás-Mihályné, G., Zaitseva, I., Rädler, J., & McLaughlin, S. (2006). Membrane-bound basic peptides sequester multivalent (PIP2), but not monovalent (PS), acidic lipids. *Biophysical journal*, 91(2), 588–99. doi:10.1529/biophysj.106.081562
- Hatzakis, N. S., Bhatia, V. K., Larsen, J., Madsen, K. L., Bolinger, P.-Y., Kunding, A. H., ... Stamou, D. (2009). How curved membranes recruit amphipathic helices and protein anchoring motifs. *Nature chemical biology*, 5(11), 835–41. doi:10.1038/nchembio.213
- Huang, K., & Martí, A. a. (2012). Optimizing the sensitivity of photoluminescent probes using time-resolved spectroscopy: a molecular beacon case study. *Analytical chemistry*, 84(18), 8075–82. doi:10.1021/ac3019894
- Jaremko, M., Jaremko, L., Kim, H.-Y., Cho, M.-K., Schwieters, C. D., Giller, K., ... Zweckstetter, M. (2013). Cold denaturation of a protein dimer monitored at atomic resolution. *Nature chemical biology*, 9(4), 264–70. doi:10.1038/nchembio.1181
- Jensen, M. B., Bhatia, V. K., Jao, C. C., Rasmussen, J. E., Pedersen, S. L., Jensen, K. J., ... Stamou, D. (2011). Membrane curvature sensing by amphipathic helices: a single

- liposome study using  $\alpha$ -synuclein and annexin B12. *The Journal of biological chemistry*, 286(49), 42603–14. doi:10.1074/jbc.M111.271130
- Junge, H. J., Rhee, J.-S., Jahn, O., Varoqueaux, F., Spiess, J., Waxham, M. N., ... Brose, N. (2004). Calmodulin and Munc13 form a  $\text{Ca}^{2+}$  sensor/effector complex that controls short-term synaptic plasticity. *Cell*, 118(3), 389–401. doi:10.1016/j.cell.2004.06.029
- Kim, J., Shishido, T., Jiang, X., Aderem, a, & McLaughlin, S. (1994). Phosphorylation, high ionic strength, and calmodulin reverse the binding of MARCKS to phospholipid vesicles. *The Journal of biological chemistry*, 269(45), 28214–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7961759>
- Kunding, A. H., Mortensen, M. W., Christensen, S. M., & Stamou, D. (2008). A fluorescence-based technique to construct size distributions from single-object measurements: application to the extrusion of lipid vesicles. *Biophysical journal*, 95(3), 1176–88. doi:10.1529/biophysj.108.128819
- Lewit-Bentley, A., & Réty, S. (2000). EF-hand calcium-binding proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 10(6), 637–643. doi:10.1016/S0959-440X(00)00142-1
- Liposomes, N. (2011). Observation of Inhomogeneity in the Lipid Composition of Individual, 33, 10685–10687.
- Madsen, K. L., Bhatia, V. K., Gether, U., & Stamou, D. (2010). BAR domains, amphipathic helices and membrane-anchored proteins use the same mechanism to sense membrane curvature. *FEBS letters*, 584(9), 1848–55. doi:10.1016/j.febslet.2010.01.053
- McLaughlin, S., & Murray, D. (2005). Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature*, 438(7068), 605–11. doi:10.1038/nature04398
- Morton L. & Yang H. (2012) Constant pressure-controlled extrusion method for the preparation of nano-sized lipid vesicles. *J.Vis.Exp.*64, e4151.
- Mueller, N. S., Wedlich-Söldner, R., & Spira, F. (2012). From mosaic to patchwork: matching lipids and proteins in membrane organization. *Molecular membrane biology*, 29(5), 186–96. doi:10.3109/09687688.2012.687461
- Johnson, J.E. & Cornell, R.B. Amphitropic proteins: regulation by reversible membrane interactions (review). *Mol. Membr. Biol.* 16, 217-235 (1999).
- Mulet, X., Templer, R. H., Woscholski, R., & Ces, O. (2008). Evidence that phosphatidylinositol promotes curved membrane interfaces. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 24(16), 8443–7. doi:10.1021/la801114n

- Peter, B.J. et al. BAR domains as sensors of membrane curvature: The amphiphysin BAR structure. *Science* 303, 495-499 (2004).
- Kunding, A.H., Mortensen, M.W., Christensen, S.M. & Stamou, D. A fluorescence-based technique to construct size distributions from single-object measurements: Application to the extrusion of lipid vesicles. *Biophysical Journal* 95, 1176-1188 (2008).
- Mulgrew-Nesbitt, A., Diraviyam, K., Wang, J., Singh, S., Murray, P., Li, Z., ... Murray, D. (2006). The role of electrostatics in protein-membrane interactions. *Biochimica et biophysica acta*, 1761(8), 812–26. doi:10.1016/j.bbaliip.2006.07.002
- Prior, I. a, & Hancock, J. F. (2012). Ras trafficking, localization and compartmentalized signalling. *Seminars in cell & developmental biology*, 23(2), 145–53. doi:10.1016/j.semcdb.2011.09.002
- Roy, M. O., Leventis, R., & Silviu, J. R. (2000). Mutational and biochemical analysis of plasma membrane targeting mediated by the farnesylated, polybasic carboxy terminus of K-ras4B. *Biochemistry*, 39(28), 8298–307. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10889039>
- Rusu, L., Gambhir, A., McLaughlin, S., & Rädler, J. (2004). Fluorescence correlation spectroscopy studies of Peptide and protein binding to phospholipid vesicles. *Biophysical journal*, 87(2), 1044–53. doi:10.1529/biophysj.104.039958
- Singer, M., Martin, L. D., Vargaftig, B. B., Park, J., Gruber, A. D., Li, Y., & Adler, K. B. (2004). A MARCKS-related peptide blocks mucus hypersecretion in a mouse model of asthma. *Nature medicine*, 10(2), 193–6. doi:10.1038/nm983
- Thompson, D. B., Cronican, J. J., & Liu, D. R. (2012). *Engineering and identifying supercharged proteins for macromolecule delivery into mammalian cells. Methods in enzymology* (1st ed., Vol. 503, pp. 293–319). Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-396962-0.00012-4
- Tiriveedhi, V., Kitchens, K. M., Nevels, K. J., Ghandehari, H., & Butko, P. (2011). Kinetic analysis of the interaction between poly(amidoamine) dendrimers and model lipid membranes. *Biochimica et biophysica acta*, 1808(1), 209–18. doi:10.1016/j.bbamem.2010.08.017
- Tsai, P.-C., Hsu, J.-W., Liu, Y.-W., Chen, K.-Y., & Lee, F.-J. S. (2013). Arl1p regulates spatial membrane organization at the trans-Golgi network through interaction with Arf-GEF Gea2p and flippase Drs2p. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(8), E668–77. doi:10.1073/pnas.1221484110

- Tzlil, S., Murray, D., & Ben-Shaul, A. (2008). The “electrostatic-switch” mechanism: Monte Carlo study of MARCKS-membrane interaction. *Biophysical journal*, 95(4), 1745–57. doi:10.1529/biophysj.108.132522
- Vongvatcharanon, S., Vongvatcharanon, U., & Boonyoung, P. (2008). Immunohistochemical localization of parvalbumin calcium-binding protein in the heart tissues of various species. *Acta histochemica*, 110(1), 26–33. doi:10.1016/j.acthis.2007.05.005
- Wang, Z., & Wang, G. (2004). APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic acids research*, 32(Database issue), D590–2. doi:10.1093/nar/gkh025
- Xu, J., Pang, Z. P., Shin, O.-H., & Südhof, T. C. (2009). Synaptotagmin-1 functions as a Ca<sup>2+</sup> sensor for spontaneous release. *Nature neuroscience*, 12(6), 759–66. doi:10.1038/nn.2320
- Yeung, T. (2013). Protein Localization, 210(2008). doi:10.1126/science.1152066
- Yeung, T., Gilbert, G. E., Shi, J., Silvius, J., Kapus, A., & Grinstein, S. (2008). Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5860), 210–3. doi:10.1126/science.1152066